Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R.-E. BADER

Chronische Nitritintoxikation bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Vieweg
aus Minden

1974

Druck- und Verlagsanstalt
Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 25563
Printed in Germany

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R.-E. BADER

Chronische Nitritintoxikation bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Vieweg
aus Minden

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. W. SCHLOTE
1. Berichterstatter:	Doz. Dr. J. SANDER
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R.-E. BADER

Herrn Prof. Dr. R.-E. BADER danke ich für die großzügigen Arbeitsbedingungen im Institut und Herrn Doz. Dr. J. SANDER für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	
1.1	Tumorinduktion durch Nitrosoverbindungen	1
1.2	Chronische und akute Nitritintoxikation	2
1.3	MRR nach chronischer Nitritaufnahme	5
1.4	Aufgaben der vorliegenden Arbeit	6
2	Material und Methodik	
2.1	Versuchstiere, Zeitplan, statistische Auswertung	7
2.2	Methämoglobinbestimmung	8
2.2.1	Methämoglobingehalt im abgenommenen Blut	9
2.3	Methämoglobinrückbildung in vitro	9
2.4	Methämoglobinrückbildung in vivo	10
2.5	Blutstatus	11
2.6	Morphologische Untersuchung	11
3	Ergebnisse	
3.1	Ausfall von Versuchstieren	12
3.2	Gewichtszunahme, Trinkwasserverbrauch, Nitritaufnahme	12
3.3	Methämoglobinrückbildung in vitro	16
3.4	Methämoglobinrückbildung in vivo	21
3.5	Blutstatus	26
3.6	Morphologische Befunde	27
4	Diskussion	
4.1	Methämoglobinämie durch nitrithaltiges Trinkwasser	29
4.2	MRR	30
4.3	MRR und Nitritkonzentration des Trinkwassers	31
4.4	MRR und Blutentnahmen	32
4.5	MRR und Reticulocyten	33
4.6	Morphologische Befunde	37
4.7	MRR und Nitritinkorporation beim Menschen	38
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	

Abkürzungen :

MRR = Methämoglobinreduktionsrate

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Es sind über 800 chemische Verbindungen bekannt, für die im Tierexperiment eine cancerogene Wirkung nachgewiesen ist. Eine große Gruppe innerhalb dieser Cancerogene bilden die Nitrosoverbindungen, die für die Krebsforschung besonders interessant sind, da sich mit diesen Substanzen bereits nach relativ kurzer Latenzzeit auch bei höheren Tieren Tumoren in zahlreichen Organen induzieren lassen. Es ist noch offen, ob den Nitrosoverbindungen eine Bedeutung für die Krebsentstehung beim Menschen zukommt (SANDER, 1971). Eine Entscheidung könnte durch epidemiologische Untersuchungen möglich sein.
Da die Synthese von Nitrosoverbindungen optimal bei pH-Werten zwischen 1 und 3 abläuft, wie sie im Magen von Versuchstieren und beim Menschen angetroffen werden (SANDER u. Mitarb., 1968), muß neben der Aufnahme der wirksamen cancerogenen Substanzen auch die ihrer Bausteine Amine, Amide und Nitrit berücksichtigt werden. Die Syntheserate der Nitrosoverbindungen ist linear von der Menge der Amine bzw. Amide abhängig. Die Menge des Nitrits geht bei den Alkylamiden als einfache Größe in die Reaktionsgleichung ein, bei den sekundären Aminen mit dem Quadrat (MIRVISH, 1970), bei den tertiären Aminen mit der 3. Potenz (SCHWEINSBERG u. SANDER, 1972). Deshalb erscheint die Annahme berechtigt, daß ein auf die Untersuchung der Beziehung zwischen der Nitritaufnahme und der Häufigkeit bestimmter Organkrebse begrenzter epidemiologischer Ansatz bereits zu ausreichenden Ergebnissen führt. Es ist hierzu die Kenntnis der vom Organismus aufgenommenen Nitritmengen erforderlich. Wäre das Ausmaß einer Nitritaufnahme hinreichend genau bekannt, so könnte nicht nur der vorerst noch hypothetische Zusammenhang zwischen Nitrosoverbindungen und der Entstehung von Tumoren beim Menschen untersucht, sondern

auch gezielter nach anderen gesundheitlichen Schäden einer chronischen Nitritintoxikation geforscht werden. Derartige gesundheitliche Folgen konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Das Ausmaß einer Nitritaufnahme könnte erfaßt werden, wenn es gelänge, eine Veränderung im Organismus zu finden, die es erlauben würde, auch vorangegangene, geringfügige Nitritintoxikationen zu erkennen.

1.2 Es muß unterschieden werden zwischen einer klinisch leicht faßbaren akuten Nitritintoxikation, die durch hohe Dosen Nitrit hervorgerufen wird und einer symptomlosen chronischen Nitritaufnahme, bei der wiederholt nur niedrige Nitritdosen inkorporiert werden.
Eine chronische Nitritaufnahme, die beim Menschen häufiger zu erwarten ist, kann durch das Trinkwasser erfolgen, wenn im Wasser enthaltenes Nitrat durch Bakterien zu Nitrit reduziert wurde. Die Höhe des Nitratgehaltes wird erheblich durch die Mineraldüngung beeinflußt. STURM und BIBO (1965) haben gezeigt, daß Gebiete mit hohem Nitratgehalt im Trinkwasser mit Zonen starker landwirtschaftlicher Bearbeitung übereinstimmen. Die starke Düngung in Weinbaugebieten muß für die besonders hohen Nitratgehalte von 100 - 400 mg/l Trinkwasser verantwortlich gemacht werden, die SCHWILLE (1969) für Wasserversorgungsanlagen des Moseltales angibt.
In der Wasserstatistik von GIEBLER (1959) sind nur 12 Wasserwerke der Bundesrepublik Deutschland und Westberlins mit mehr als 50 mg NO_3^- /l aufgeführt, das sind 2,1 % der erfaßten öffentlichen Gewinnungsanlagen. 47 % hatten einen Gehalt zwischen 0 und 5 mg. Da jedoch die Stickstoffdüngung erheblich zugenommen hat und weiter ansteigt, ist mit einer Verschiebung zu höheren Nitratwerten zu rechnen. Vom Anstieg der Nitratwerte sind zahlreiche Länder betroffen. So berichten GRUENER und SHUVAL (1970) von

180 Quellen in Israel mit einem NO_3^- -Gehalt von bereits über 45 mg/l und weiteren 50 Quellen mit einer Zunahme von 2 mg NO_3^- /l und mehr pro Jahr. Neben der verstärkten Düngung ist die zunehmende Belastung der Böden mit Abfallstoffen für die steigenden Nitratgehalte verantwortlich (HÖLL, 1970).

Das Vorkommen von Nitrat im Trinkwasser weist auf mögliche gesundheitsschädliche Verunreinigungen hin, und der Entwurf einer Trinkwasser-Verordnung aus dem Jahre 1973 gibt hierfür einen Grenzwert von 50 mg NO_3^- /l an. Entgegen früheren Entwürfen wird Nitrat außerdem erstmals als gesundheitsschädlicher chemischer Stoff aufgeführt, wobei als Grenzwert ein Gehalt von 100 mg NO_3^- /l genannt wird (BUNDESMINISTER FÜR JUGEND, FAMILIE UND GESUNDHEIT, 1973). Die Weltgesundheitsorganisation empfielt, Trinkwasser mit Nitratwerten unter 50 mg/l zu verwenden, Werte zwischen 50 und 100 mg gelten noch als akzeptabel, Werte über 100 mg NO_3^- /l sollten vermieden werden (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1970). Nach SATTELMACHER (1962) sollen in den einzelnen Staaten folgende Grenzwerte gelten: Schweiz 20 mg/l, DDR 30 mg/l, USA und UdSSR 40 mg/l für NO_3^- im Trinkwasser. Die mögliche Gefährdung durch Nitrat wird also nicht einheitlich beurteilt.

Neben dem Trinkwasser kommt den pflanzlichen Nahrungsmitteln eine erhebliche Bedeutung bei der Nitritaufnahme zu. Nitrit ist in frischen Nahrungsmitteln im allgemeinen nur in geringen Mengen enthalten. Es kann allerdings nachträglich durch bakterielle Reduktion aus Nitrat entstehen, wenn Speisen unsachgemäß aufbewahrt werden, z.B. bei unzureichender Kühlung. Die Reduktion des nichttoxischen Nitrats kann nicht nur außerhalb des Körpers, sondern auch im oberen Magen-Darm-Trakt erfolgen, in dem bei verminderter Magenacidität eine Besiedlung mit nitratreduzierenden Bakterien möglich wird (CORNBLATH u. HARTMANN, 1948). Von den Chenopodiaceen Spinat, Rote Beete, Futter-

und Zuckerrüben sowie den Kruziferen, zu denen z.B. verschiedene Kohlarten gehören, ist bekannt, daß sie Nitrat in größeren Mengen speichern können. Die für Pflanzen beschriebenen Höchstwerte an Nitrat-N erreichen 1600 mg/kg Frischsubstanz (LANG, 1970), wobei das Ausmaß der Nitratspeicherung stark von der Mineraldüngung abhängt (SCHUPHAN, 1969).
Durch den Verzehr nitratspeichernder Pflanzen können somit erhebliche Mengen Nitrat bzw. Nitrit aufgenommen werden. Bereits Nitratgehalte, die deutlich unter den oben genannten Höchstwerten liegen, können nach entsprechender Reduktion des Nitrats zu akuten Intoxikationen führen, wie sie wiederholt nach Spinatmahlzeiten beobachtet wurden (SINOIS, 1964; SINOIS u. WODSACK, 1965).
Den akuten Intoxikationen liegt eine durch Nitrit verursachte Methämoglobinbildung zugrunde. Eine Methämoglobinämie ist ebenso durch nitrathaltiges Trinkwasser möglich, wie sie 1945 von COMLY erstmals beschrieben wurde. Die ersten Berichte aus Deutschland veröffentlichten SOUCHON (1956) und WEDEMEYER (1957). Nach Angaben von SATTELMACHER (1963) wird in der Weltliteratur über 1255 Fälle von Methämoglobinämie berichtet, von denen 102 tödlich verliefen. Nach einer Umfrage an deutschen Kinderkliniken sind in den Jahren 1956 bis 1964 745 Erkrankungen an alimentärer Methämoglobinämie festgestellt worden. Bei etwa einem Drittel der Fälle lagen Angaben über das verwendete Trinkwasser vor. In 97,3 % stammte das Wasser aus Einzelbrunnen, und in über 80 % betrug der Nitratgehalt mehr als 100 mg/l (SIMON u. Mitarb., 1964). Das Überwiegen von Werten über 100 mg/l wird auch von GROSS (1964) mitgeteilt.
Von den auch als Spinatmethämoglobinämie und Brunnenwassermethämoglobinämie bezeichneten Erkrankungen sind vor allem Säuglinge im 1. Trimenon betroffen, bei denen eine so starke Methämoglobinbildung auftreten kann, daß

es zu einer Gefährdung der Sauerstoffversorgung des Körpers kommt (SIMON u. Mitarb., 1964; KÜBLER u. SIMON, 1969). Die Weltgesundheitsorganisation bezeichnet deshalb Nitratwerte im Trinkwasser über 45 mg NO_3^- /l für Säuglinge als gefährlich (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1971).

Neben der Methämoglobinbildung übt Nitrit noch andere Wirkungen auf den Organismus aus, so eine Störung der Umwandlung von ß-Carotin in Vitamin A, Verhinderung der Jodaufnahme in die Schilddrüse (LANG, 1970), Lähmung der Gefäßmuskulatur und damit Blutdrucksenkung. Alle diese Wirkungen des Nitrits sind reversibel.

Die Häufigkeit der schweren, nitritbedingten Methämoglobinämie ist in den letzten Jahren zurückgegangen, obwohl ein ständiger Anstieg des Nitratgehaltes von Trinkwasser und pflanzlichen Nahrungsmitteln angenommen werden muß. Dies ist auf eine Verbesserung der Trinkwasserhygiene durch den Übergang von Einzelbrunnen zur öffentlichen Wasserversorgungsanlage und auf die sachgerechtere Aufbewahrung von Nahrungsmitteln zurückzuführen.

Im Gegensatz zur akuten Intoxikation hat die Frage nach den gesundheitlichen Folgen einer wiederholten Aufnahme niedriger Nitritdosen an Bedeutung gewonnen, besonders seitdem im Tierexperiment die cancerogene Wirkung von Nitrosoverbindungen nachgewiesen werden konnte.

1.3 DRUCKREY u. Mitarb. (1963) haben Nitrit auf chronisch toxische Wirkung an Ratten geprüft. Sie fanden bei täglicher oraler Gabe von 100 mg Natriumnitrit pro kg Körpergewicht an 3 Generationen von Ratten im Blutbild und an den Organen keinen Anhalt für eine Schädigung. Allerdings beschrieben sie eine verstärkte Methämoglobinrückbildungsrate (MRR) bei den mit Nitrit behandelten Tieren.

Nach GREENBERG (1943), JUNG und REMMER (1949) reagiert 1 Mol Nitrit mit sauerstoffgesättigtem Hämoglobin unter Bildung von 2 Val Methämoglobin. Im Methämoglobin ist das 2-wertige Eisen des Hämoglobinmoleküls zum 3-wertigen oxydiert. Durch Enzymsysteme in den Erythrocyten erfolgt die Reduktion zum Fe^{++}. Nach den Befunden von DRUCKREY u. Mitarb. (1963) muß nach einer chronischen Nitritintoxikation die Fähigkeit der Erythrocyten zur Methämoglobinrückbildung gesteigert sein. Diese Feststellung war der Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen.

1.4 In dieser Arbeit soll im Tierexperiment geprüft werden:

1) Mit welchen Nitritdosen kann eine deutliche Erhöhung der Methämoglobinrückbildungsrate (MRR) erreicht werden?
2) Ist aus der verstärkten MRR ein Rückschluß auf die verabreichte Nitritmenge möglich?
3) Finden sich bei langfristiger Nitritgabe Veränderungen im Blutbild oder an den Organen?

2 Material und Methodik

2.1

Versuchstiere: Für die Versuche wurden 110 bis 125 g schwere, weibliche Albinoratten verwendet (Stamm SIV-50 des Züchters Ivanovas, Kißlegg, Allgäu). 36 dieser ungefähr 40 Tage alten Ratten wurden in 6 gleichstarke Gruppen aufgeteilt, durch Ohrzeichen markiert und in Makrolonkäfigen untergebracht.

3 Gruppen erhielten Natriumnitrit im Trinkwasser und zwar als 0,2 , 0,4 und 0,8 %ige Lösungen, die zweimal pro Woche frisch angesetzt wurden. Die 0,8 %ige Lösung wurde nach 14 Tagen gegen eine 0,6 %ige ausgetauscht. Nach den Nitritkonzentrationen ihres Trinkwassers werden die Gruppen im folgenden Text kurz als Gruppe 0 , 0,2 , 0,4 und 0,6 bezeichnet.

Die einzelnen Versuchsserien in der Gruppe 0 wurden mit jeweils anderen Tieren der 3 Kontrollgruppen durchgeführt, um eine Doppelbelastung mit Nitrit zu vermeiden. Nachfolgend wird jedoch nicht in diese Untergruppen aufgeschlüsselt, sondern alle Ergebnisse werden zusammengefaßt unter der Gruppe 0 aufgeführt.

Die Bestimmung des Flüssigkeitverbrauchs erfolgte durch tägliches Wiegen der Trinkwasserflaschen. Das Gewicht der Ratten wurde jede Woche ermittelt. Die Tiere erhielten Standardfutter (Altromin^{R}) in Form von Pellets und Trinkwasser ad libitum.

Zeitplan: Es wurden 5 Versuchsserien durchgeführt:

I.	23. - 28.	Versuchstag:	MRR in vitro
II.	35. - 40.	" :	"
III.	60. - 66.	" :	"
IV.	109. - 119.	" :	MRR in vivo
V.	150. - 154.	" :	Blutstatus

Der Zeitraum zwischen der I. und der II. Serie betrug somit 12 Tage, zwischen der II. und der III. 25 Tage. Die In-vivo-Versuche folgten nach 49, die hämatologische Untersuchung nach weiteren 35-41 Tagen. Die Experimente wurden nach insgesamt 155 Tagen mit der Sektion der Tiere abgeschlossen.

Statistische Auswertung: Zur statistischen Beurteilung des Zahlenmaterials wurden Mittelwertvergleiche mittels Student-Test (mit F-Test) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde in allen Fällen $\alpha = 0{,}05$ verwendet. Angaben zur Streuung beziehen sich jeweils auf die Standardabweichung (s).

2.2 Methämoglobinbestimmung

Die Bestimmung des Methämoglobins erfolgte nach der Methode von EVELYN und MALLOY (1938) und der Modifikation von HAVEMANN u. Mitarb. (1939). Bei diesem Verfahren wird die Auslöschung der Methämoglobinbande bei 630 nm nach Zugabe von Kaliumcyanid, d.h. nach Umwandlung des Methämoglobins in Cyanmethämoglobin, ausgenutzt: Scharf zentrifugiertes Hämolysat wurde in 2 Proben aufgeteilt und zur 2.Probe ein Tropfen einer 5 %igen Kaliumferricyanidlösung gegeben, wodurch das Hämoglobin innerhalb weniger Minuten zum Methämoglobin oxydierte. In Kuvetten von 10 mm Schichtdicke wurden im Spektralphotometer bei 630 nm die Extinktionen E der Proben gegen Wasser als Leerwert bestimmt. Es waren 4 Messungen erforderlich:

1. Messung (E1) : Probe 1
2. " (E2) : Probe 2
3. " (E3) : Probe 1 nach Zugabe von 1 Tropfen einer 1 %igen KCN-Lösung
4. " (E4) : Probe 2 nach Zugabe von 1 Tropfen einer 1 %igen KCN-Lösung

Nach folgender Formel ergibt sich aus den gemessenen Extinktionen der prozentuale Anteil des Methämoglobins am Gesamthämoglobin:

$$\frac{E1 - E3}{E2 - E4} \times 100 = \text{Methämoglobinanteil (\%)}$$

Die Blutentnahmen erfolgten aus den gestauten Schwanzgefäßen nach Kupieren der Schwanzspitze. 0,8 ml Blut wurden mit 0,2 ml einer 3,8 %igen Natriumcitratlösung versetzt und mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Mit dieser Stammsuspension wurden die nachfolgenden Messungen durchgeführt.

2.2.1 Zur Bestimmung des momentanen Methämoglobingehaltes im abgenommenen Blut wurden 1,5 ml der Stammsuspension benötigt, die Erythrocyten 1 mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in 4 ml aqua dest. hämolysiert. Nach 5 min wurden zum Hämolysat 5 ml einer Mischung aus 19 Teilen physiologischer Kochsalzlösung und 1 Teil 2 M Phosphatpuffer pH 6,8 gegeben und 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. 6 ml des Überstandes wurden in Probe 1 und Probe 2 aufgeteilt und der Methämoglobingehalt bestimmt.

2.3 Methämoglobinrückbildung in vitro

(I.-III. Versuchsserie, 23.-66. Versuchstag)

Die verbleibende Stammsuspension wurde 4 min bei 2.300 U/min zentrifugiert, das Zentrifugat mit 10 ml einer Mischung aus 3 Teilen physiologischer Kochsalzlösung und 1 Teil isotonischem Natriumphosphatpuffer pH 6,8 versetzt, ebenso zentrifugiert und die Pufferlösung von den Erythrocyten abpipettiert.

Um eine möglichst vollständige Umwandlung des Hämoglobins in Methämoglobin zu erreichen, wurden 0,25 ml einer frisch angesetzten, 1,5 %igen Natriumnitritlösung, sowie

0,4 ml der obigen, isotonischen Phosphatpuffermischung pH 6,8 zugegeben und für 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen (3 mal in physiologischer Kochsalzlösung und 2 mal in einer Mischung aus 10 Teilen physiologischer Kochsalzlösung und 1 Teil isotonischem Phosphatpuffer pH 7,45) wurden die Erythrocyten in 10 ml der Pufferlösung pH 7,45 aufgeschwemmt. Nach Zugabe von 0,8 ml physiologischer Kochsalzlösung, in der 32 mg Glucose gelöst waren, wurde der Ansatz im Brutschrank bei 37°C inkubiert und dort alle 15 min leicht geschüttelt. 5 mal wurden je 2 ml entnommen (nach 30, 90, 150, 240 und 360 min), die Erythrocyten 1 mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und hämolysiert.
Die Methämoglobinbestimmung erfolgte wie unter 2.2 beschrieben.

2.4 Methämoglobinrückbildung in vivo

(IV. Versuchsserie, 109.-119. Versuchstag)

Etwa 50 Tage nach Beendigung der In-vitro-Versuche erhielten sämtliche Tiere für 12-14 Stunden nitritfreies Trinkwasser. Dadurch wurde erreicht, daß der Methämoglobingehalt im Blut der Nitrittiere auf physiologische Werte abfiel und damit gleiche Ausgangsbedingungen für die nachfolgende Methämoglobinämie durch Nitritinjektion geschaffen wurden.

Die Tiere erhielten eine intraperitoneale Injektion einer Stammlösung aus 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung und 1 Teil einer 2,5 %igen Natriumnitritlösung, wobei die verabfolgte Menge 40 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht entsprach. Die Blutentnahmen erfolgten nach 20, 50, 80, 120, 180, 270 und 360 Minuten . 1 Tropfen Blut wurde in 4 ml aqua dest. hämolysiert, nach 5 min wurden 4 ml einer Mischung aus 19 Teilen physiologischer Kochsalzlösung und 1 Teil 2 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben und scharf

zentrifugiert. 6 ml des Überstandes wurden abpipettiert und das Methämoglobin nach 2.2 bestimmt.
Von der Nitritinjektion bis zur letzten Blutentnahme blieben die Tiere nüchtern.

2.5 Blutstatus

(V. Versuchsserie, 150.-154. Versuchstag)

Nach einem Intervall von 35-40 Tagen wurde den Tieren erneut Blut abgenommen (0,8 ml) und Hämoglobingehalt (Hb), Hämatokrit (Hk), Anzahl der Erythrocyten und der Reticulocyten bestimmt. Das Hämoglobin wurde als Cyanmethämoglobin gemessen, die Erythrocytenzahl photometrisch ermittelt (im Erymaten, Fa. Hellige). Die Reticulocytenzählung erfolgte nach Färbung mit Brillantkresylblau am Objektträger. +

2.6 Morphologische Untersuchung (155. Versuchstag)

Sämtliche Tiere der 3 Nitritgruppen, sowie 6 Kontrolltiere, die kein Nitrit erhalten hatten, wurden gewogen, mit Äther betäubt, durch Entbluten getötet und seziert. Die Organe Herz, Milz, Leber und Niere wurden nach Feststellung der Organgewichte makroskopisch beurteilt und für die histologische Untersuchung in Formalin fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden die Organe geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.
Zum Nachweis von Eisen in den Organen Milz, Leber und Niere wurde die Berliner-Blau-Reaktion durchgeführt. ++

+ Für ihre freundliche Hilfe danke ich Frau Tragenatsch und Frau Kaufhold, Medizinische Poliklinik Tübingen.

++ Frau Ladenstein, Hygiene Institut Tübingen, danke ich für ihre Mitarbeit bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

3 Ergebnisse

3.1 Ausfall von Versuchstieren

In der Gruppe 0,2 fiel ein Tier nach 20 Tagen durch Gewichtsabnahme auf. Es wurde isoliert und erhielt nitritfreies Trinkwasser. Die Ratte starb nach 78 Tagen. In der Blase und in beiden Nieren fanden sich zahlreiche, bis linsengroße Steine, außerdem Eiter im rechten Nierenbecken. In der Gruppe 0,8 starb eine Ratte nach 10 Tagen. Ihr Körpergewicht war von 115 auf 100 Gramm abgesunken. Da auch andere Tiere dieser Gruppe teilweise ähnliche Gewichtsverluste aufwiesen, wurde die Nitritkonzentration des Trinkwassers von 0,8 auf 0,6 % reduziert. Trinkwasserverbrauch und Tiergewichte der betroffenen Gruppen wurden auf 5 Tiere umgerechnet und Experimente mit den ausgefallenen Tieren nicht verwertet.

3.2 Gewichtszunahme, Trinkwasserverbrauch, Nitritaufnahme

Die Kontrolltiere verdoppelten ihr Anfangsgewicht in 35 Tagen, die Gruppe 0,2 in 42, die Gruppe 0,4 in 50 und die Gruppe 0,6 in 85 Tagen (Abbildung 1). Die Gruppe 0,6 erhielt die ersten 11 Versuchstage 0,8 %ige, ab 15. Tag 0,6 %ige Nitritlösung und dazwischen nitritfreies Trinkwasser. Daraus erklärt sich der Sprung in der Gewichtskurve der Gruppe 0,6.

Der tägliche Trinkwasserverbrauch schwankte in allen Gruppen außerordentlich stark. Zur Auswertung wurde daher der Versuchszeitraum in acht Abschnitte unterteilt und der durchschnittliche Verbrauch während der einzelnen Zeitabschnitte ermittelt. Wegen der unterschiedlichen Zunahme der Tiergewichte in den einzelnen Gruppen wurden die Trinkwassermengen zum besseren Vergleich auf 1 Kg Körpergewicht bezogen.

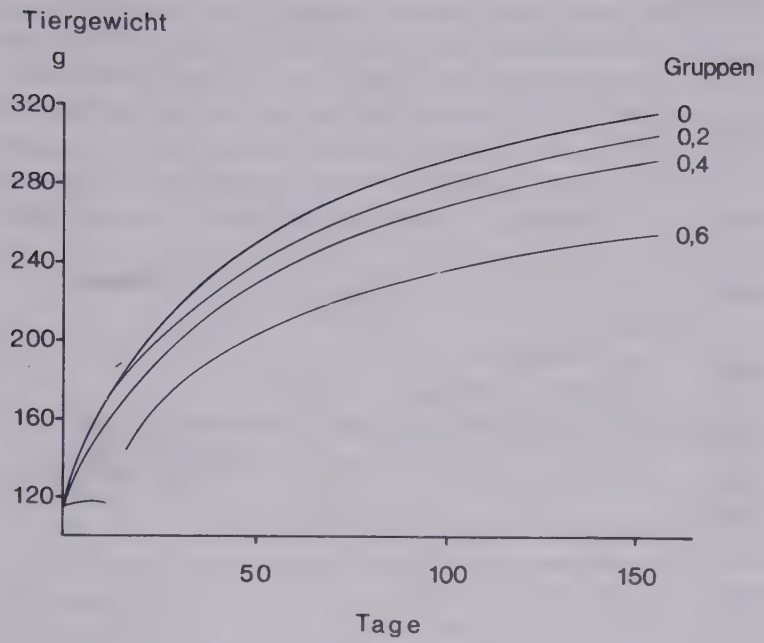

Abb. 1 : Gewichtszunahme der Versuchstiere

Die Kontrollgruppe benötigte mit etwa 40 Lebenstagen (Versuchsbeginn) eine tägliche Flüssigkeitszufuhr von 16 % ihres Körpergewichtes. Diese Menge fiel allmählich bis zum 200. Lebenstag auf 8,5 % ab. Die Nitritgruppen nahmen erheblich weniger Flüssigkeit auf, mit Ausgangswerten von 13 % (Gruppe 0,2) und 10 % (Gruppe 0,4). In den ersten Wochen fiel der Verbrauch der Gruppe 0,4 annähernd parallel zu dem der Kontrollgruppe ab, der der Gruppe 0,2 hingegen beschleunigt, bis nach etwa 30 Versuchstagen ebenfalls der zur Kontrollgruppe parallele Abfall erreicht wurde. Die Flüssigkeitsaufnahme pro Kg Körpergewicht verringerte sich bei den Nitrittieren

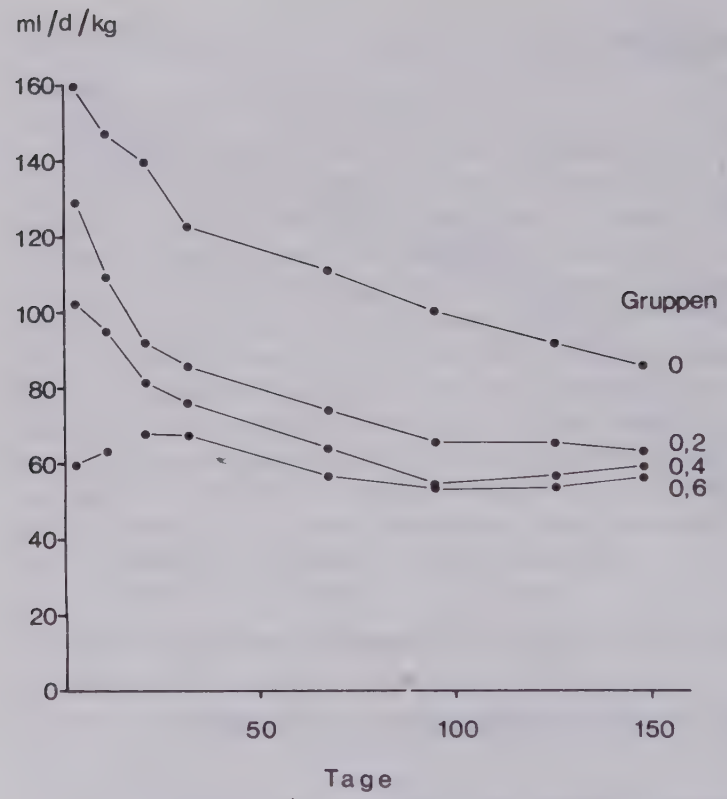

Abb. 2 : Trinkwasserverbrauch der einzelnen Versuchsgruppen (in ml/kg Körpergewicht und Tag)

nach dem 100. Versuchstag nicht weiter, sondern stieg infolge der erhöhten experimentellen Belastung (In-vivo-Versuch, Blutstatus) in den letzten Versuchswochen leicht an (Abbildung 2). Durch die Änderung der Nitritkonzentration kann die Gruppe 0,6 erst vom 16. Tag an gewertet werden. Der weitere Verlauf entspricht dem der übrigen Nitrittiere. Die auf das Körpergewicht bezogenen, täglich

aufgenommenen Nitritmengen lassen sich anhand der Abbildung 2 ermitteln. Entsprechend der Flüssigkeitsaufnahme verringerten sie sich allmählich, in der Gruppe 0,2 von 258 mg/kg auf 124 mg, in der Gruppe 0,4 von 407 auf 213 mg und in der Gruppe 0,6 von 473 auf 317 mg/kg. Die während des Versuchszeitraumes insgesamt aufgenommenen Nitritmengen sind in der Tabelle 1 wiedergegeben.

	Gruppen			
	0	0,2	0,4	0,6 (0,8)
Anzahl der Tage mit $NaNO_2$	-	154	154	140 (11)
Trinkmenge $\frac{ml}{Tier\ u.\ Tag}$	24,5	16,0	13,0	11,0 (3,6)
$NaNO_2$ im Trinkwasser $\frac{mg}{Tier\ u.\ Tag}$	-	32,37	53,54	66,15
Aufgenommenes $NaNO_2$ (einschl. Injektionen) $\frac{g}{Tier}$	-	5,0	8,3	9,8

Tabelle 1 : Trinkwasserverbrauch. Aufgenommene Nitritmengen.

3.3 Methämoglobinrückbildung in vitro

Durch die Zugabe von Natriumnitrit zum abgenommenen Blut wurde das Hämoglobin zu über 90 % in Methämoglobin umgewandelt. 4 Stunden nach der Inkubation mit Glucosezusatz waren diese Maximalwerte bis auf einen Anteil von weniger als 40 % abgefallen. Die Reduktion war bei der Gruppe 0,6 am stärksten ausgeprägt, die Erythrocyten der übrigen Gruppen zeigten eine geringere Fähigkeit zur Methämoglobinrückbildung. Zwischen den Gruppen 0 und 0,2 bestand ein derart geringer Unterschied, daß in der Abbildung 3 keine getrennte Darstellung möglich war.
Als ein Maß für die Methämoglobin-Rückbildungsfähigkeit kann die während einer bestimmten Zeit erreichte Reduktion herangezogen werden. Als geeignet hat sich die Differenz aus den gemessenen Methämoglobinwerten 30 Minuten und 4 Stunden nach der Inkubation erwiesen. Für die III. Versuchsserie, an der auch die Kontrolltiere beteiligt waren, ergaben sich folgende Zahlenwerte:
In der Gruppe 0,2 betrug der Methämoglobingehalt nach 30 Minuten 89,4 % vom Gesamthämoglobin und nach 4 Stunden 37,8 %. Während der 3 1/2 Stunden wurden somit 51,6 % Methämoglobin reduziert, was dem Wert für die Kontrolltiere entspricht. Für die Gruppen 0,4 und 0,6 ergaben sich Reduktionswerte von 55,8 bzw. 60,3 % (Tabelle 2).

Versuchsserie	Gruppe 0	Gruppe 0,2	Gruppe 0,4	Gruppe 0,6
I. 23.-28.Tag	-	47,8	52,4	56,1
II. 35.-40.Tag	-	56,7	60,9	65,7
III.60.-66.Tag	52,0	51,6	55,8	60,3

Tab. 2 : Reduktionsraten in vitro. Anteil des Methämoglobins am Gesamthämoglobin, der während der Meßzeit von 3 1/2 Stunden reduziert wurde (Angaben in %).

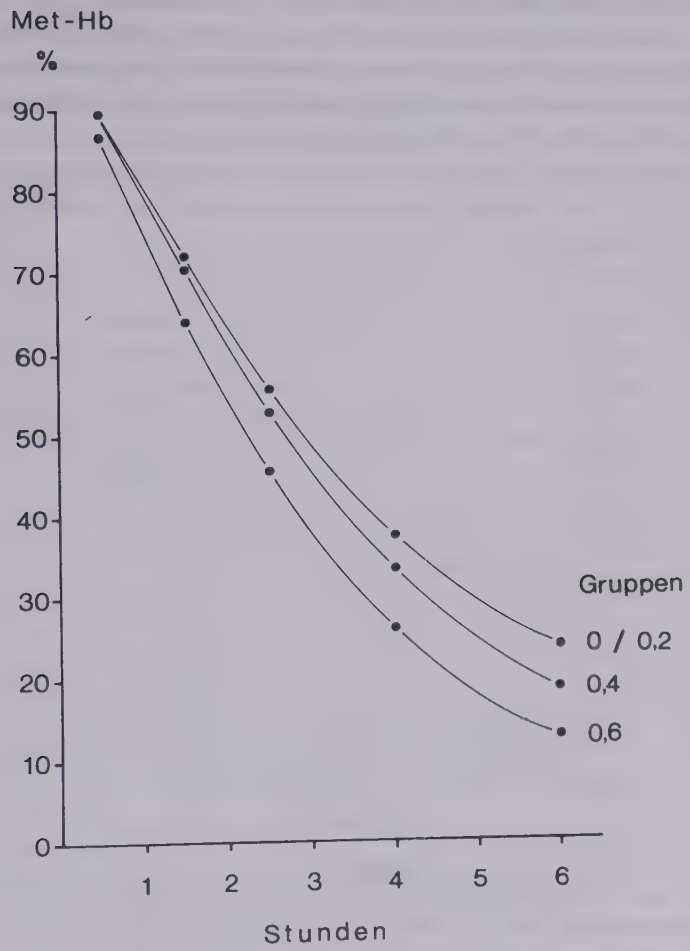

Abb. 3 : Rückbildung von Methämoglobin (Met-Hb) in vitro

In der Abbildung 4 ist das Ausmaß der Methämoglobinrückbildung während der Meßzeit von 3 1/2 Stunden mit den Standardabweichungen wiedergegeben. Die Werte stammen aus der III. Versuchsserie (Tab.2). Bei den Tieren der Gruppe 0,6 war die Methämoglobinrückbildung signifikant erhöht ($0{,}02 > p > 0{,}01$).

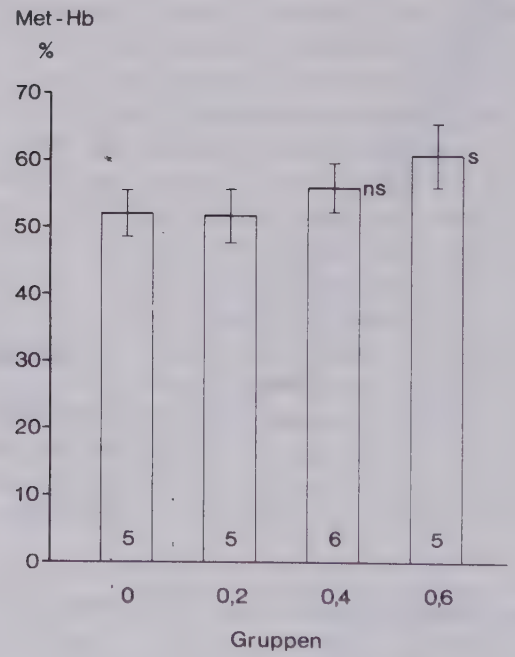

Abb. 4 : Methämoglobinrückbildung in vitro. Darstellung der Reduktionsraten der III. Versuchsserie (Tab.2) mit Standardabweichungen.
Signifikant erhöhte Rückbildung der Gruppe 0,6 ($0{,}02 > p > 0{,}01$). ns = nicht signifikant
s = signifikant
In den Säulen ist die Anzahl der Versuchstiere eingetragen (vgl. Abb. 5, 7, 8).

Die Methämoglobingehalte 4 Stunden nach der Inkubation sind in der Abbildung 5 dargestellt. Die statistische Auswertung ergab für die Gruppe 0,6 eine signifikante Abweichung gegenüber der Kontrollgruppe ($0{,}01 > p > 0{,}005$). Bei der Interpretation muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Reduktionskurven (Abb.3) unterschiedliche Ausgangswerte hatten (Gruppe 0,2 und 0,4 89,5 %, gegenüber 86,7 % Methämoglobin der Gruppe 0,6).

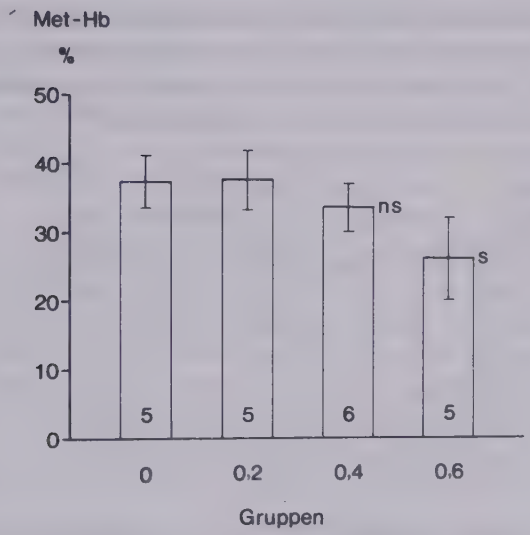

Abb. 5 : Methämoglobinrückbildung in vitro. Darstellung der Methämoglobingehalte 4 Stunden nach der Inkubation (Abb. 3) mit Standardabweichungen.

Die II. Versuchsserie, die 12 Tage nach der I. durchgeführt wurde, ergab gegenüber der I. eine deutliche Erhöhung der Methämoglobinrückbildungsraten(MRR) (Tab. 2). Die Gruppe 0,2 erreichte Werte, die in der I. Serie nur

von der Gruppe 0,6 erzielt wurden. In der III.Serie, die nach der längeren Pause von 25 Tagen folgte, schwächten sich diese Werte wieder ab. Das Ausmaß der Rückbildung war somit bei der gleichen Gruppe in den verschiedenen Serien unterschiedlich. Die Verstärkung in der II. und die Verminderung in der III. Serie betraf allerdings alle Gruppen in der gleichen Weise, das Verhältnis der Rückbildungsraten der einzelnen Gruppen innerhalb einer Versuchsserie blieb damit konstant.

Die Gabe des nitrithaltigen Trinkwassers wurde vor den Blutentnahmen für die In-vitro-Versuche nicht unterbrochen. Durch die Bestimmung des Methämoglobins im abgenommenen Blut konnte daher das Ausmaß der Methämoglobinämie in vivo erfaßt werden (Tabelle 3).

	Gruppen			
Versuchsserie	0	0,2	0,4	0,6
I. 23.-28.Tag	-	4,2	12,6	14,7
II. 35.-40.Tag	-	4,1	13,8	17,4
III. 60.-66.Tag	(3,4)	4,8	13,3	17,9

Tab. 3 : Methämoglobinämie in vivo. Methämoglobingehalt im abgenommenen Blut.
Angegeben ist der prozentuale Anteil des Methämoglobins am Gesamthämoglobin.

3.4 Methämoglobinrückbildung in vivo

Nach einer intraperitonealen Injektion von Natriumnitrit wird ein bestimmter Anteil des Hämoglobins zu Methämoglobin oxydiert. Für die In-vivo-Versuche wurde eine Dosis von 40 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht gewählt, die bei Kontrolltieren zu einem Methämoglobinanteil von 60 % am Gesamthämoglobin führte. Die Werte streuten zwischen 57 und 63 %.

Nach der Injektion stieg der Methämoglobingehalt rasch an. Nach 20 Minuten waren rund 40 % des Hämoglobins oxydiert, nach gut einer Stunde der Maximalwert von 60 % erreicht. Im Verlauf von 4 Stunden fiel dieser Wert dann auf unter 10 % ab.

Durch sieben Messungen innerhalb von sechs Stunden konnte der zeitliche Ablauf der Methämoglobinämie erfaßt werden. Dabei fanden sich Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. In Abbildung 6 ist die Bildung und Rückbildung des Methämoglobinanteils dargestellt. Die Oxydation lief bei allen Gruppen ähnlich schnell ab, die Kurve der Gruppe 0,6 erreichte jedoch nicht den erwarteten Wert von 60 %, sondern ging vorzeitig in den absteigenden Kurvenanteil über. Bei der Gruppe 0,4 war dieses vorzeitige Erreichen des Kurvenmaximums weniger ausgeprägt, bei der Gruppe 0,2 fast aufgehoben. Die für die Kontrolltiere gefundene Beziehung zwischen der Nitritdosis und dem Ausmaß der Methämoglobinämie muß demnach für die behandelten Tiere abgeändert werden. Bei der Gruppe 0,6 führten 40 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht im Durchschnitt zu 57,5 % Methämoglobin, bei der Gruppe 0,4 zu 59,5 und bei der Gruppe 0,2 (wie bei der Gruppe 0) zu 60 %.

Das Ausmaß der Methämoglobinämie nach einer einmaligen Nitritinjektion war somit bei den Tieren geringgradig vermindert, die die höchsten Nitritkonzentrationen im Trinkwasser erhalten hatten.

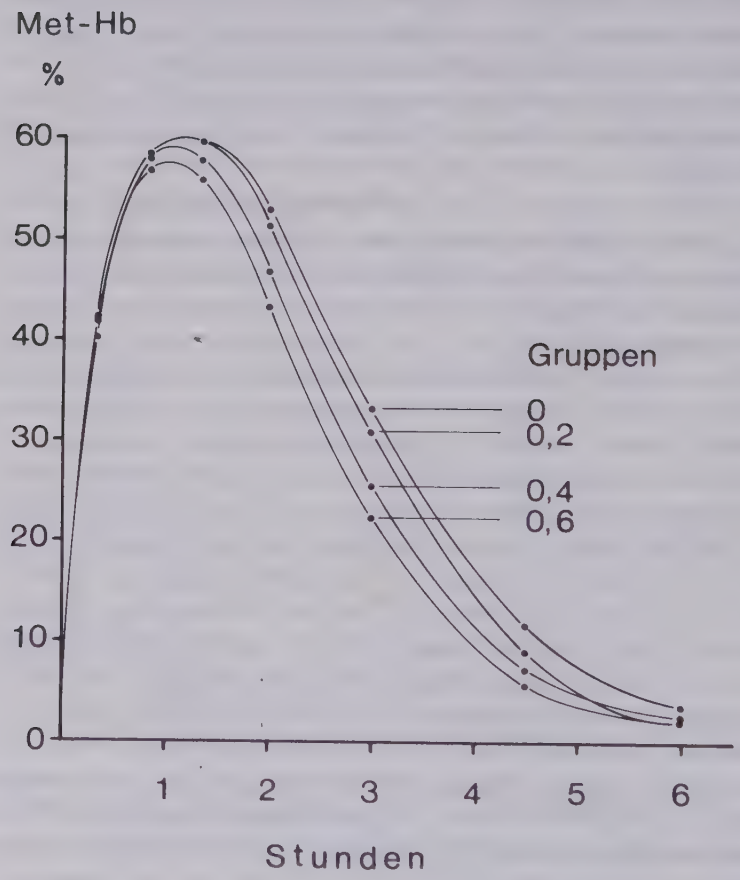

Abb. 6 : Bildung und Rückbildung von Methämoglobin (Met-Hb) in vivo nach intraperitonealer Injektion von 40 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht.

Aus der Abbildung 6 lassen sich außerdem diejenigen Zeiten ablesen, die benötigt wurden, bis der Methämoglobinanteil auf den halbmaximalen Wert abgefallen war. Hierdurch wird ein Vergleich der verschiedenen Gruppen möglich. Der halbmaximale Wert war bei den Kontrolltieren nach 190 Minuten, bei der Gruppe 0,6 aber bereits nach 160 Minuten erreicht (Tabelle 4).

	Gruppen			
	0	0,2	0,4	0,6
maximaler Methämoglobingehalt (%)	60	60	59,5	57,5
Zeit bis 1/2 max. Methämoglobingeh. (min)	190	180	165	160
"Methämoglobinfläche" (FE)	184,8	180,2	165,7	151,3

Tab. 4 : maximaler Methämoglobingehalt nach Injektion von 40 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht i.p.
Zeit, nach der der Methämoglobinspiegel auf den 1/2 maximalen Wert abgefallen war.
"Methämoglobinflächen" (siehe Text)
Die Zahlenangaben sind aus der Abb. 6 ermittelt.

Bestimmt man die Flächen, die in der Abbildung 6 von den Methämoglobinkurven und der Abszisse eingeschlossen werden, so erhält man eine weitere Möglichkeit, die Versuchsgruppen durch eine charakteristische Größe zu beschreiben. Die Methämoglobingehalte fielen innerhalb der Versuchszeit nicht bis auf die physiologischen Werte ab, die

Methämoglobinkurven in der Abbildung 6 sind somit am Versuchsende noch unterschiedlich weit von der Abszisse entfernt. Die beschriebenen Flächen wurden daher bis zu einer im Zeitpunkt T = 5 Stunden auf der Abszisse errichteten Senkrechten gemessen. Diese "Methämoglobinflächen" werden in Tabelle 4 und Abbildung 7 in Flächeneinheiten (FE) angegeben. 1 FE entspricht die Fläche desjenigen Rechtecks, das durch eine Strecke auf der Abszisse mit der Länge 1 (Einheit Stunden) und eine Strekke auf der Ordinate mit ebenfalls der Länge 1 (Einheit % Methämoglobin) festgelegt wird.

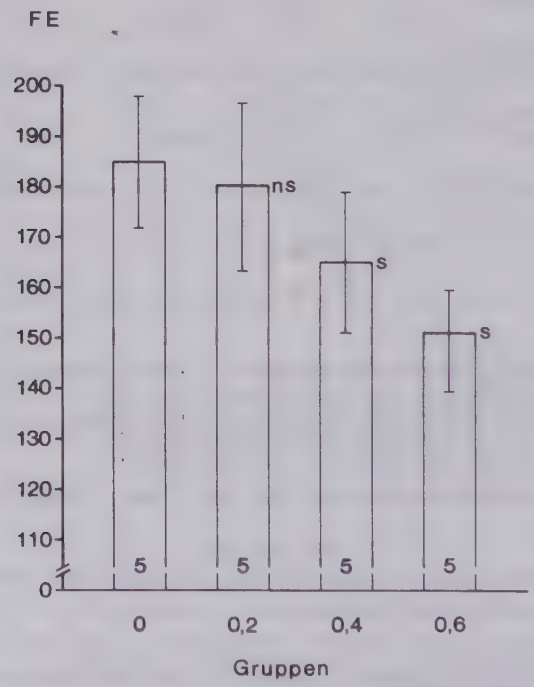

Abb. 7 : Methämoglobinrückbildung in vivo. Darstellung der"Methämoglobinflächen" mit Standardabweichungen. (Einheit FE und Signifikanzen siehe Text).

Die verstärkte Methämoglobinrückbildung führte bei den Nitrittieren zu kleineren "Methämoglobinflächen". Die Abnahme ließ sich statistisch sichern (Gruppe 0,4: $0,05 > p > 0,025$ und Gruppe 0,6: $0,005 > p > 0,001$), Abb.7. Die Bestimmung der "Methämoglobinflächen" verlangt eine genaue Kenntnis des Kurvenverlaufes, d.h. es ist eine größere Zahl von Blutentnahmen mit photometrischer Messung des Methämoglobins erforderlich. Es wurde daher

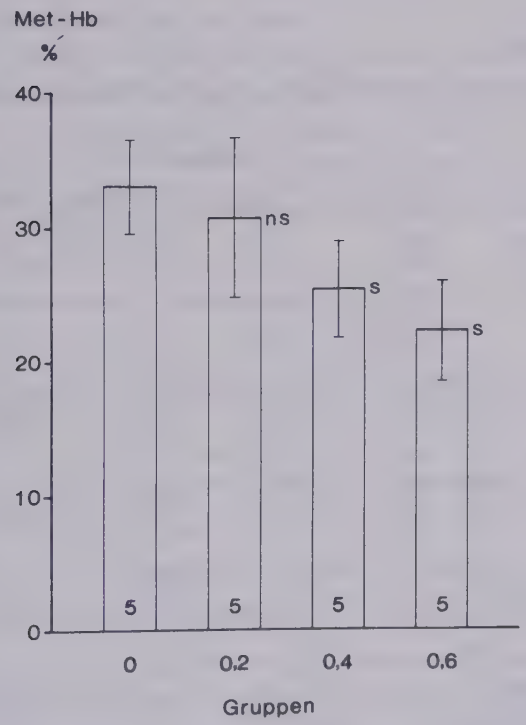

Abb. 8 : Methämoglobinrückbildung in vivo. Methämoglobingehalt 3 Stunden nach Injektion von 40 mg $NaNO_2^-$/kg Körpergewicht. Gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigte Werte bei den Gruppen 0,4 ($0,02 > p > 0,01$) und 0,6 ($0,005 > p$ $p > 0,001$).

geprüft, ob u.U. eine einzige Methämoglobinbestimmung verläßliche Aussagen erlauben würde. Als geeignet erwiesen sich die Methämoglobingehalte 3 Stunden nach der Nitritinjektion. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind mit den Standardabweichungen in der Abbildung 8 angegeben. Wie mit der Flächenmethode (Abb.7) fand sich eine signifikant verstärkte Methämoglobinrückbildung bei den Tieren der Gruppen 0,4 und 0,6 (Gruppe 0,4: $0{,}02 > p > 0{,}01$ und Gruppe 0,6: $0{,}005 > p > 0{,}001$).

3.5 Blutstatus

Die hämatologischen Befunde sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt:

	Gruppen			
	0	0,2	0,4	0,6
Hämoglobin (Hb) $\frac{g}{100\ ml}$	14,6 ± 0,8	13,5 ± 2,0	12,6 ± 1,0	12,1 ± 1,1
Erythrocyten $\frac{Mill.}{cmm}$	5,5 ± 0,5	5,1 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,0 ± 0,1
Hämatokrit (Hk) %	46,7 ± 1,5	46,2 ± 2,3	46,3 ± 3,2	45,6 ± 3,6
Reticulocyten %	3,3 ± 1,0	3,6 ± 0,3	4,9 ± 1,6	6,0 ± 0,9
Hämoglobingehalt des Einzelerythrocyten (Hb_E) pg	27,0	26,4	24,1	24,3
Hämoglobinkonzentration im Einzelerythrocyten % (HbK_E)	31,3	29,2	27,2	26,6
Durchschnittsvolumen des Einzelery. μ^3	84,1	89,9	90,8	91,2

Tab. 5 : Blutstatus. Angabe der Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichungen s .

Der Hämoglobingehalt und die Anzahl der Erythrocyten war bei den behandelten Tieren erniedrigt, der Hämatokritwert blieb annähernd konstant. Vergrößert war das durchschnittliche Erythrocytenvolumen, die Hämoglobinkonzentration im Einzelerythrocyten erniedrigt. Mit steigender Nitritkonzentration im Trinkwasser fand sich ein Anstieg der Reticulocytenzahl von 3,3 % (Gruppe 0) über 3,6 (0,2) und 4,9 (0,4) bis auf 6,0 % (0,6).

3.6 Morphologische Befunde

Bei der Sektion der Tiere konnte kein krankhafter Befund erhoben werden. Die Organe sämtlicher Tiere waren makroskopisch unauffällig, die Organgewichte der Nitrittiere allerdings z.T. erhöht. So wogen die Nieren in der Gruppe 0 im Durchschnitt 1850 mg, in der Gruppe 0,6 dagegen 2288 mg (Tabelle 6).

	Gruppen			
	0	0,2	0,4	0,6
Tiergewicht (g)	321 ± 24	306 ± 13	295 ± 34	257 ± 27
Herz (mg)	806 ± 52	824 ± 81	851 ± 95	764 ± 87
Milz (mg)	596 ±106	612 ± 83	745 ±160	610 ±101
Leber (mg)	10592 ± 815	10172 ± 924	9912 ±1215	9192 ± 901
Nieren (mg)	1850 ± 107	1976 ± 239	2166 ± 268	2288 ± 225

Tab. 6 : Tier- und Organgewichte.
Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichungen s.

Histologisch fand sich an den Organen Herz, Leber und Niere kein Anhalt für eine Schädigung durch die chronische Nitritintoxikation. Bei den Milzpräparaten fiel eine teilweise erhebliche Pigmentablagerung in der roten Pulpa auf. Die Berliner-Blau-Reaktion auf Eisen war positiv. Bei allen Tieren der Gruppe O waren die Eisenablagerungen gleichermaßen schwach ausgeprägt (+), bei den Tieren der Nitritgruppen durchweg stärker, jedoch mit außerordentlichen Schwankungen innerhalb der Gruppen (++ bis ++++). In den Organen Leber und Niere konnte kein Eisen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Reduktion von Methämoglobin ist eine notwendige Leistung des Organismus, ohne die sich der Gleichgewichtszustand zwischen Hämoglobin und Methämoglobin bei einem Methämoglobinanteil von 40 - 50 % einstellen würde (FINCH, 1948). Beim Menschen müssen täglich 3 % des Blutfarbstoffs reduziert werden, um den Anteil des Methämoglobins am Gesamthämoglobin unter 1 % zu halten (WALLER, 1964).

4.1 In den eigenen Versuchen wurden bei Ratten die Methämoglobinreduktionsraten (MRR) nach chronischer Nitritgabe untersucht. Es wurde eine möglichst starke Belastung der Tiere durch Methämoglobin angestrebt und deshalb sehr nitritreiches Trinkwasser gegeben. Das Ausmaß der Methämoglobinämie läßt sich aus den Werten der Tabelle 3 ablesen. Die angegebenen Werte sind geringfügig überhöht, was bei den Kontrolltieren mit 3,4 % deutlich wird. Der Grund hierfür besteht in der spontanen Oxydation des Hämoglobins während des Zeitraumes zwischen Blutentnahme und Messung. Da die Werte nur eine Orientierung über die Methämoglobinämie geben sollten, wurden die Proben immer erst dann photometriert, wenn das Meßgerät nicht für den vorrangigen In-vitro-Hauptversuch benötigt wurde. In Vorversuchen war bei unbehandelten Tieren unter 2 % Methämoglobin gemessen worden. MUSIL (1966) fand Normalwerte zwischen 0,7 und 1,4 %. HEUBNER u. Mitarb. (1947) geben 0,8 % an.

Die Methämoglobingehalte aus Tabelle 3 wurden in Blutproben bestimmt, die zwischen 7.00 und 8.00 Uhr entnommen worden waren. Zu dieser Tageszeit wurde bereits erheblich weniger Nitritlösung getrunken, als während der Nachtstunden, mit einer maximalen Aufnahme zwischen 24.00 und 6.00 Uhr. Nur ca. 25% des Gesamtbedarfes wur-

den zwischen 7.00 und 20.00 Uhr getrunken. GRUENER und SHUVAL (1970) fanden bei Ratten mit 0,3 bzw. 0,45 %iger Nitritlösung als Trinkwasser eine Aufnahme von über 80 % der täglichen Wassermenge während der Nachtstunden.
Die im abgenommenen Blut gemessenen höchsten Einzelwerte erreichten 30 % Methämoglobin. Berücksichtigt man die Trinkgewohnheiten der Versuchstiere, so ergibt sich, daß bei den Tieren der Gruppen 0,4 und 0,6 nachts für einige Stunden ein maximaler Methämoglobinspiegel von wahrscheinlich über 30 % erreicht wurde.
Eine stärkere Methämoglobinämie konnte durch Ad-libitum-Gabe nitrithaltigen Trinkwassers nicht erzielt werden, denn die Verabreichung 0,8 %iger Lösung am Beginn der Versuche mußte abgebrochen werden, weil die Tiere z.T. erheblich an Gewicht verloren hatten.

4.2 DRUCKREY u. Mitarb. (1963) hatten, wie eingangs (1.3) erwähnt, bei Ratten nach täglicher Gabe von 100 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht mit dem Trinkwasser im Langzeitversuch eine gegenüber Kontrolltieren verstärkte Methämoglobinrückbildungsrate (MRR) beschrieben. Bei unbehandelten Tieren führte die Gabe dieser Dosis mit der Schlundsonde nach 1 Stunde 40 Minuten zu einem Methämoglobingehalt von knapp 60 %. Dieser Wert war 5 Stunden nach der Injektion auf 20 % abgefallen. In den eigenen Versuchen wurde Nitrit intraperitoneal gegeben. Hier führte die Dosis von 40 mg/kg nach gut einer Stunde zu einem maximalen Methämoglobingehalt von ebenfalls 60 % , der jedoch schneller abfiel. Der Grund für den späteren Gipfel und den verzögerten Kurvenabfall in den Versuchen von DRUCKREY u. Mitarb. (1963) wird in der Verzögerung der Aufnahme von Nitrit über den Magen-Darm-Trakt bei oraler Applikation gesehen.
Der zeitliche Ablauf der Methämoglobinämie war bei den behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren in cha-

rakteristischer Weise verändert. Der Methämoglobinspiegel war in einer kürzeren Zeit nach der Injektion von Nitrit wieder auf den Ausgangswert abgefallen, wobei die bei den Kontrolltieren gemessenen maximalen Methämoglobingehalte nicht erreicht wurden.
Diese Veränderung läßt sich auf eine erhöhte MRR zurückführen, die in den Versuchen von DRUCKREY u. Mitarb. (1963) einen maximalen Methämoglobingehalt von lediglich 50 % bei den mit Nitrit vorbehandelten Tieren bewirkte, gegenüber 60 % bei den Kontrolltieren. 5 Stunden nach der Nitritgabe waren diese Werte auf 5 % (behandelte Tiere) bzw. 20 % (unbehandelte Tiere) abgefallen. In den eigenen Versuchen war der Einfluß der chronischen Nitritgabe nicht so deutlich ausgeprägt, die Differenz in den Maximalwerten betrug 2,5 %. Die Anwendung der Flächenmethode (3.4) auf die Versuche von DRUCKREY u. Mitarb. (1963) ergab eine Fläche von 212,7 FE bei den unbehandelten und 148,2 FE bei den behandelten Tieren. Die Fläche der Kontrolltiere übertraf somit die der Nitrittiere um den Faktor 1,44. Bei den eigenen Tieren unterschieden sich die Flächen der Gruppen 0 und 0,6 um den Faktor 1,22.

4.3 In der Einleitung war nach derjenigen Nitritdosis gefragt worden, die zu einer deutlichen Erhöhung der MRR führt. Für den In-vivo-Versuch sind in der Abb. 7 die "Methämoglobinflächen" und in der Abb. 8 der Gehalt des Blutes an Methämoglobin 3 Stunden nach der Injektion von Nitrit wiedergegeben. Ein Unterschied ist zwischen den Gruppen 0 und 0,2 zwar nach den Mittelwerten vorhanden, jedoch aufgrund der erheblichen Streuung statistisch nicht zu sichern. Der die MRR steigernde Einfluß der chronischen Nitritgabe wird erst bei der Gruppe 0,4 deutlich. Die Konzentration von 0,4 % $NaNO_2$ im Trinkwasser war erforderlich, um eine signifikante Zunahme der MRR

zu erreichen (Abb. 7 und 8). Diese Aussage gilt nicht für das Einzeltier, sondern nur für Gruppen, wenn deren durchschnittliche Reduktionsraten verglichen werden. Soll die Aussage auch für das einzelne Tier gelten, muß die Nitritdosis auf mindestens 0,6 % erhöht werden. Erst bei dieser Nitritkonzentration ist die MRR derart gesteigert, daß ein einzelnes Tier mit hoher Wahrscheinlichkeit als behandelt erkannt werden kann, während die sichere Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe nicht möglich ist. Der Einfluß der chronischen Nitritintoxikation auf die MRR läßt sich mit den In-vitro-Versuchen nicht so gut erfassen wie in vivo. Der erniedrigte Methämoglobingehalt 4 Stunden nach der Inkubation ist für die Beurteilung der Gruppe 0,6 nicht geeignet (Abb. 5), da die Reduktionskurven unterschiedliche Ausgangswerte hatten (siehe 3.3). In der Abb. 4 wird dieser Fehler vermieden, weil von der Reduktionsdifferenz von zwei gemessenen Werten ausgegangen wird. Signifikant unterschieden sich lediglich die MRR der Gruppen 0 und 0,6. Die geringere Aussagefähigkeit der In-vitro-Versuche zeigt sich auch in den praktisch identischen Kurven für die Gruppen 0 und 0,2.

4.4 Bisher wurde nur der Zusammenhang zwischen der MRR und den Nitritkonzentrationen des Trinkwassers beschrieben. Tabelle 2 zeigt jedoch, daß das Ausmaß der Rückbildung noch von anderen Faktoren abhängt. In allen 3 Versuchsserien fand sich ein linearer Anstieg der Reduktionsraten von der Gruppe 0,2 über 0,4 bis zur Gruppe 0,6. Eine graphische Darstellung dieses Befundes würde 3 den Versuchsserien entsprechende Parallelen ergeben, die allerdings gegeneinander verschoben wären, denn die MRR der III. Serie übertrafen deutlich die der I., aber noch erheblich stärker wurde das Methämoglobin in der II. Serie reduziert. Nach der I. Serie war offenbar das Reduktionssystem der Tiere verändert. Diese Veränderung hielt bis

zur II. Serie an und wirkte verstärkend auf die MRR, während es in der III. Serie zu keiner erneuten Steigerung der Rückbildung kam, sondern die Werte leicht zurückfielen. Die Veränderung des Reduktionssystems muß daher von begrenzter Dauer gewesen sein. Die III. Serie wurde 25 Tage nach der II. durchgeführt, der Zeitraum war damit doppelt so lang wie zwischen der I. und der II. Serie.
Durch die Langzeitgabe konstanter Nitritkonzentrationen kann die unterschiedliche MRR der einzelnen Versuchsserien nicht erklärt werden. Die Tiere waren jedoch während der In-vitro-Versuche einer zusätzlichen Belastung ausgesetzt: der wiederholten Entnahme von Blut. Die Anämisierung mit nachfolgender Regeneration muß daher die Ursache der verstärkten MRR gewesen sein. Die Regenerationsprozesse dauerten während der II. Serie offenbar noch an, waren hingegen bereits bis zur III. Serie annähernd abgelaufen, weshalb sich die Werte der letzten Serie wieder denen der I. näherten.

4.5 Für die MRR sind zwei Enzyme wesentlich, die Diaphorase (NADH-Methämoglobinreductase) und eine NADPH-abhängige Reductase (BETKE, 1970). Die Anlieferung von $NADH_2$ erfolgt über die Glykolyse, $NADPH_2$ wird im Pentosephosphatzyklus gebildet. Beide Stoffwechselwege sind auch im reifen Erythrocyten erhalten geblieben (RAPOPORT, 1969). Die Erhöhung der Rückbildungsrate ist von einer Vermehrung oder Aktivitätssteigerung der benötigten Enzyme abhängig. In einer jüngeren Erythrocytenpopulation ist die Gesamtenzymmenge größer als in einer älteren, wobei die Reticulocyten die größten Enzymmengen bzw. -aktivitäten besitzen (RAPOPORT, 1969).
Bei den behandelten Tieren fanden sich erhöhte Reticulocytenzahlen (siehe 3.5), während die Hämoglobinkonzentrationen und die Erythrocytenzahlen vermindert waren

(Tab. 5). MUSIL (1966) fand bei Ratten mit 10 bzw. 20 mÄqu $NaNO_2$ im Trinkwasser (690 bzw. 1380 mg/l), übereinstimmend mit den eigenen Befunden, eine Erniedrigung der Erythrocytenzahl und der Hämoglobinkonzentration im Einzelerythrocyten und eine Zunahme des Durchschnittsvolumens des Einzelerythrocyten, dagegen eine Erhöhung des Hämatokrits, sowie eine unveränderte Hämoglobinkonzentration des Blutes. MUSIL(1966) sah in der Vergrößerung der Erythrocytenoberfläche den Hauptmechanismus eines funktionellen Ausgleichs der Methämoglobinbildung, wodurch die Abgabe des am restlichen funktionsfähigen Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs erleichtert würde. Größere Bedeutung kann der jüngeren Erythrocytenpopulation der Nitrittiere beigemessen werden, auf die die Reticulocytenvermehrung hinweist. Die Reticulocytenzahl betrug bei der Kontrollgruppe 3,3 % , hingegen 6 % bei der Gruppe 0,6. Einen Normalwert von 3,3 % gibt auch HAGEMANN(1960) für weibliche Ratten an, allerdings kämen spontane tägliche Schwankungen vor und es könnten Normalwerte bis zu 10 % gefunden werden. Nach GANZONI (1970) beträgt der Normalwert für 250 g schwere Ratten 2,0 % Reticulocyten.

Der stärkste physiologische Reiz der Erythropoese ist die Hypoxie. Schon kurzdauernde Minderversorgung mit Sauerstoff führt zu einer Stimulation der Erythropoese. Von HEILMEYER und RÜTHENSTROTH-BAUER wurde festgestellt, daß es im Tierexperiment ausreicht, eine größere Blutmenge abzunehmen und sofort zu reinjizieren, um eine Reticulocytenkrise auszulösen (zit. nach HEIMPEL, 1968).
Bei den behandelten Tieren fiel mit steigender Nitritkonzentration im Trinkwasser durch die Umwandlung von Hämoglobin in Methämoglobin ein wachsender Anteil des Blutfarbstoffs für den O_2-Transport aus (Tab. 3). Die Stimulation der Erythropoese führte zu einer entsprechenden Erhöhung der Zahl der Reticulocyten (Tab. 5). In die-

sem größeren Anteil an Reticulocyten wird die Ursache für die erhöhten MRR gesehen.
Bei Ratten zirkulieren die Reticulocyten unter physiologischen Bedingungen nur 1,2 - 1,4 Tage, bei Anämie 2,5 - 3 Tage (GANZONI, 1970). Die Erhöhung der MRR durch Anämisierung hielt jedoch über mindestens 12 Tage an (siehe 4.4). Das bedeutet, daß mit dem Verlust der anfärbbaren Netzstruktur die Reticulocyten nicht plötzlich in funktionell anders beschaffene Zellen übergehen. Die MRR nimmt mit dem Alter der roten Blutzellen ab (JALAVISTO u, Mitarb., 1959), die Enzymsysteme werden weniger leistungsfähig. Entsprechend findet sich in gealterten Erythrocyten ein gegenüber jüngeren Zellen erhöhter Methämoglobingehalt (JUNG, 1949; WALLER u. Mitarb., 1959). Nach Gabe von Nitrit sind an der Methämoglobinämie die älteren Zellen wiederum stärker beteiligt als die jüngeren (BREWER u. Mitarb., 1962). BETKE u. Mitarb. (1960) konnten in durch Zentrifugieren getrennten älteren Erythrocyten allerdings keine gegenüber jüngeren Zellen verminderte MRR nachweisen. Sie diskutierten eine Beeinflussung des Methämoglobingehaltes alter Erythrocyten durch die jüngeren, auf die Befunde von JUNG u. Mitarb. (1954) hinwiesen. Diese Autoren konnten zeigen, daß die MRR in solchen Zellen, die Methämoglobin enthalten, durch methämoglobinfreie Zellen gefördert wird.
Die Methämoglobinrückbildung in Reticulocyten hat MATTHIES (1956) untersucht. Er fand einen Anstieg der MRR mit steigender Reticulocytenzahl. Zu einer Verdopplung der Rückbildungsgeschwindigkeit führte ein Reticulocytengehalt von 20 %, die Extrapolation auf 100 % ergab eine 6 bis 7-fach erhöhte Aktivität der Reticulocyten gegenüber einer reticulocytenfreien Suspension.
Die in den eigenen Versuchen ermittelte Abhängigkeit der MRR von der Zahl der Reticulocyten ist in der Abbildung 9 zusammengefaßt. Entsprechend dem Anstieg der Reticulo-

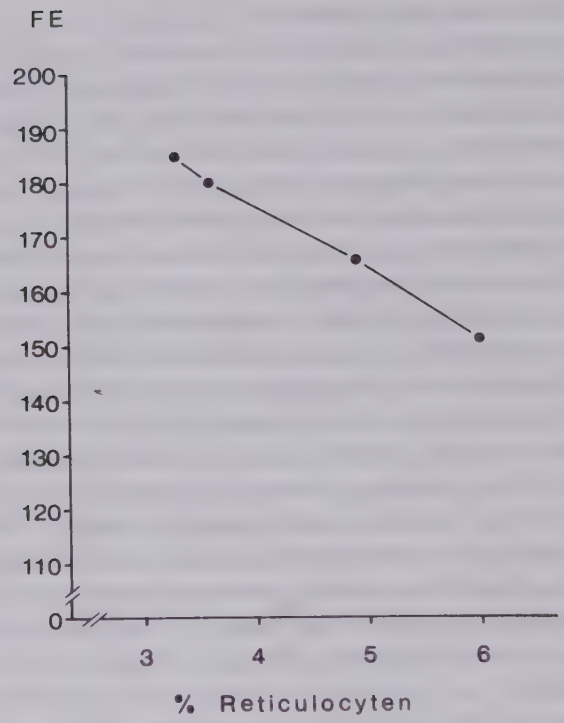

Abb. 9 : Abnahme der "Methämoglobinfläche"(FE) mit steigender Reticulocytenzahl als Folge der erhöhten MRR.
(siehe Tab. 4, Tab. 5 und Abb. 7)

cyten nahm die MRR zu und damit die "Methämoglobinfläche" des In-vivo-Versuches ab.
Die Erhöhung der Reticulocytenzahl wurde durch die Gabe von Nitrit und durch die Entnahme von Blut erreicht. Die Werte der I. Versuchsserie sind auf den Einfluß des Nitrits zurückzuführen, in den weiteren Serien erfolgt eine Überlagerung durch die Anämisierung. Es kann angenommen werden, daß bei fortgesetzter konstanter Belastung eines

Organismus mit Nitrit keine weitere Erhöhung der Reduktionsraten eintritt, da das Ausmaß der Hypoxie als Folge der Methämoglobinämie gleichbleibt.
Zugleich wird deutlich, daß die Erhöhung der MRR eine unspezifische Reaktion des Organismus darstellt, da jede Vermehrung der Reticulocyten die MRR beeinflußt.

Als weiterer Faktor zur Steigerung der Erythropoese muß die Hämolyse diskutiert werden. HARLEY und ROBIN (1962) fanden eine Hämolyse nur in vitro bei hohen Dosen Nitrit. Nach CLARK (1951) besitzt Methämoglobin selbst keinen Einfluß auf die Hämolyse, jedoch besteht nach MATTHIES (1954) ein Zusammenhang zwischen der Methämoglobinrückbildung und der osmotischen Resistenz der Erythrocyten. Kationentransport und Methämoglobinrückbildung benötigen z.T. die gleichen Stoffwechselsysteme der Zellen. Bei erhöhten Methämoglobingehalten können diese Stoffwechselsysteme derart durch die Methämoglobinrückbildung beansprucht werden, daß es zu einer Störung im Kationentransport mit einer Verminderung der osmotischen Resistenz kommt. Eine Hämolyse als Mitursache der Reticulocytenvermehrung ist somit denkbar, jedoch kann sie für die eigenen Versuche aufgrund der histologischen Befunde weitgehend ausgeschlossen werden.

4.6 DRUCKREY u. Mitarb. (1963) fanden nach der Langzeitgabe von Nitrit keine Veränderungen an den Organen, die als Zeichen einer chronischen toxischen Schädigung gedeutet werden konnten. Demgegenüber beschrieben HUEPER und LANDSBERG (1940) eine Schwellung und Hyalinisierung der Media der Herzkranzgefäße, eine Herzvergrößerung mit Hypertrophie des linken Ventrikels, Myocarddegeneration, Fibrose und Narbenbildung, außerdem eine chronische Stauung der Leber mit pericentraler fettiger Degeneration, eine Arteriosklerose der Nierengefäße und eine hyaline Degeneration der Tubenepithelien. Diese Verände-

rungen konnten die Autoren allerdings nicht bei allen Tieren nachweisen, es gab auch Normalbefunde. WINTER u. Mitarb. (1964) verabreichten Nitrat und Nitrit an Weidekühe und beschrieben folgende histologische Veränderungen: degenerative Schäden der Koronararterien, Infiltrate aus Lymphocyten und Plasmazellen im Myocard, Nekrosen der Glomerula der Nieren sowie vereinzelt tubuläre Degenerationen.
In den eigenen Untersuchungen fand sich kein Unterschied zwischen den Organen der behandelten und denen der Kontrolltiere. Bei den Nitrittieren fiel lediglich die verstärkte Eisenablagerung in der Milz auf, hingegen blieb die Berliner-Blau-Reaktion von Leber und Niere negativ. Dieser Befund spricht gegen eine stärkere Hämolyse, vielmehr dürfte die Eisenablagerung durch Resorption nach Verletzung der Schwanzvenen bei den Blutabnahmen bedingt sein. Für diese Annahme spricht ebenfalls die geringere Eisenablagerung in den Milzen der Kontrolltiere. Die sezierten Kontrolltiere waren an dem In-vivo-Versuch nicht beteiligt (siehe 2.1), ihre Blutentnahmen waren deshalb seltener als bei den Nitrittieren.

4.7 Es konnten bisher keine gesundheitlichen Schäden einer chronischen Nitritaufnahme nachgewiesen werden. In der Einleitung wurde die Notwendigkeit von weiteren Untersuchungen betont, die auch die Antwort auf die Frage ermöglichen könnten, ob den Nitrosoverbindungen eine Bedeutung für die Krebsentstehung beim Menschen zukommt. Wie dargestellt wurde, ist Nitrit ein wesentlicher Reaktionspartner bei der Synthese von Nitrosoverbindungen. Bei Kenntnis der von einem Organismus aufgenommenen Nitritmenge könnte deshalb eine Aussage über seine Krebsgefährdung möglich werden. Nitrit kann durch bakterielle Reduktion aus dem nichttoxischen Nitrat entstehen. Wegen des sehr unterschiedlichen Ausmaßes dieser Reduktion ge-

lingt es nicht, z.B. vom Nitratgehalt des Trinkwassers Rückschlüsse auf die Krebsgefährdung zu ziehen. Es ist deshalb erforderlich, ein Untersuchungsverfahren zu finden, das es erlaubt, die Menge des aufgenommenen Nitrits zu bestimmen. Dieses Verfahren muß hinreichend empfindlich und spezifisch sein.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Nitrit auf die Rückbildungsrate von Methämoglobin untersucht. Mit dem Trinkwasser wurde an Ratten eine sehr hohe Nitritkonzentration gegeben, die über einige Stunden Methämoglobinwerte von über 30 % bewirkte. In den In-vitro-Versuchen unterschieden sich die Gruppen 0 und 0,6 signifikant, d.h. eine Nitritkonzentration von 0,6 % war erforderlich, um die Rückbildungsraten nachweisbar zu beschleunigen. Im In-vivo-Versuch unterschieden sich bereits die Gruppen 0 und 0,4, dennoch ist das Verfahren der Bestimmung der MRR zu unempfindlich, als daß es auf den Menschen übertragen werden könnte.

Wie KIESE u. Mitarb. (1968) an Versuchspersonen gemessen haben, führt eine intravenöse Injektion von 12 mg $NaNO_2$/kg Körpergewicht zu einem Methämoglobingehalt von 30 %, doch bewirkten bereits Dosen von 4mg/kg langanhaltenden Blutdruckabfall und Anstieg der Pulsfrequenz. Da die Aufnahme derart hoher Nitritkonzentrationen auf Einzelereignisse , z.B. Spinatvergiftung, beschränkt ist, ist eine Erhöhung der MRR nicht zu erwarten.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche kann folgendes über die Bestimmung der MRR beim Menschen gesagt werden: Durch die Aufnahme hoher Nitritdosen kann eine meßbare Erhöhung der MRR bewirkt werden. Für den Nachweis der z.B. mit dem Trinkwasser inkorporierten Nitritmengen ist die Bestimmung der MRR jedoch nicht geeignet. Die Erhöhung der MRR konnte auf eine Vermehrung der Reticulocyten im peripheren Blut zurückgeführt werden. Ausgelöst wurde diese Vermehrung durch die als Folge der

Umwandlung von Hämoglobin in Methämoglobin auftretende Hypoxie. Eine durch die Aufnahme nitrithaltigen Trinkwassers beim Menschen verursachte Methämoglobinbildung ist zu gering, als daß sie zu einer Erhöhung der Reticulocytenzahl führen könnte. Außerdem ist die Erhöhung der MRR nicht spezifisch (siehe 4.5).
Es muß daher festgestellt werden, daß aufgrund einer erhöhten MRR kein Rückschluß auf eine vorausgegangene Nitritinkorporation möglich ist.

5 Zusammenfassung

Albinoratten erhielten als Trinkwasser über 154 Tage 0,2 , 0,4 bzw. 0,6 %ige Natriumnitritlösungen.
Nach Gabe von Nitrit wird Hämoglobin zu Methämoglobin oxydiert. Durch Enzymsysteme in den Erythrocyten erfolgt die Reduktion. Die Methämoglobinreduktionsraten (MRR) waren bei den behandelten Tieren in Abhängigkeit von den Nitritkonzentrationen ihres Trinkwassers erhöht, wie durch Versuche in vitro und in vivo nachgewiesen werden konnte. Eine gegenüber den Kontrolltieren in vitro signifikant erhöhte MRR fand sich bei der Gruppe mit 0,6 %iger Nitritlösung, durch Messung der MRR in vivo ließ sich die Erhöhung bereits bei den Tieren mit 0,4 %iger Lösung statistisch sichern.
Die Erhöhung der MRR beruhte auf einer Vermehrung der Reticulocyten im peripheren Blut von normal 3,0 % bis auf 6,0 %, deren Ursache in einer Hypoxie durch Methämoglobinbildung gesehen wird.
Als Methode zum Nachweis von Nitritinkorporationen ist die Bestimmung der MRR nicht geeignet, da für eine Erhöhung sehr hohe Nitritdosen erforderlich sind und die MRR keine spezifische Reaktion des Organismus auf Nitrit darstellt.

Nach einer Versuchszeit von 155 Tagen wurden die Tiere seziert. An den Organen Herz, Milz, Leber und Niere ergab sich kein Anhalt für eine Schädigung durch die chronische Nitritintoxikation.

6 Literaturverzeichnis

BETKE, K.:
Methämoglobinämien
In: Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II/2,
5. Aufl., S. 425 - 442
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1970

BETKE, K., A. BALTZ, E. KLEIHAUER und F. SCHOLZ:
Methämoglobingehalt, Methämoglobinreduktion und Sauerstoffverbrauch in jungen und alten Erythrocyten.
Blut 4, 203 - 212 (1960)

BREWER, G. J., A. R. TARLOV, R. W. KELLERMEYER and A. S. ALVING:
The hemolytic effect of primaquine.
XV. Role of methemoglobin.
J. Lab. clin. Med. 59, 905 - 917 (1962)

BUNDESMINISTER FÜR JUGEND, FAMILIE UND GESUNDHEIT:
Entwurf einer Verordnung über Trinkwasser und über Brauchwasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasser-Verordnung) nach § 11(2) Bundesseuchengesetz. Bonn (1973)

CLARK, B. B., R. W. MORRISSEY and D. BLAIR:
Relation of methemoglobin to hemolysis.
Blood 6, 532 - 543 (1951)

COMLY, H. H.:
Cyanosis in infants caused by nitrates in well water.
J. Amer. med. Ass. 129, 112 - 116 (1945)

CORNBLATH, M. and A. F. HARTMANN:
Methemoglobinemia in young infants.
J. Pediat. 33, 421 - 425 (1948)

DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, H. BEUTHNER, H. SCHNEIDER und P. KLÄRNER:
Prüfung von Nitrit auf chronisch toxische Wirkung an Ratten.
Arzneimittel-Forsch. 13, 320 - 323 (1963)

EVERLYN, K. A. and H. T. MALLOY:
Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood.
J. biol. Chem. 126, 655 - 662 (1938)

FINCH, C. A.:
Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia.
New Engl. J. Med. 239, 470 - 478 (1948)

GANZONI, A. M.:
Kinetik und Regulation der Erythrocytenproduktion. Experimentelle Untersuchungen an der normalen und anämischen Ratte.
Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik 31.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1970

GIEBLER, G.:
Chemische Wasserstatistik der Wasserwerke in der Bundesrepublik Deutschland und Westberlin.
München: Oldenbourg 1959

GREENBERG, L. A., D. LESTER and H. W. HAGGARD:
The reaction of hemoglobin with nitrite.
J. biol. Chem. 151, 665 - 673 (1964)

GROSS, E.:
Vergiftung durch Aufnahme von Nitraten im Trinkwasser und in Pflanzen bei Kleinstkindern und bei Nutztieren.
Arch. Hyg. (Berl.) 148, 28 - 39 (1964)

GRUENER, N. and H. J. SHUVAL:
Health aspects of nitrates in drinking water.
In: Developments in Water Quality Research.
London: Arbor 1970

HAGEMANN, E.:
Ratte und Maus.
Berlin: de Gruyter 1960

HARLEY, J. D. and H. ROBIN:
The effect of the nitrite ion on intact human erythrocytes.
Blood 20, 710 - 721 (1962)

HAVEMANN, R., F. JUNG und B. v. ISSEKUTZ:
Die Bestimmung von Methämoglobin im Blute mit dem lichtelektrischen Kalorimeter.
Biochem. Z. 301, 116 - 124 (1939)

HEIMPEL, H.:
Erythropoese und Erythrocytenumsatz.
In: Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II/1,
5. Aufl., S. 514 - 584
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1968

HEUBNER, W. und M. KIESE:
Der Hämiglobingehalt normalen Blutes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
204, 313 - 322 (1947)

HÖLL, K.:
Wasser. 5. Aufl.
Berlin: de Gruyter 1970

HUEPER, W. C. and J. W. LANDSBERG:
Pathologic changes in the organs of rats produced by chronic nitrite poisoning.
Arch. Path. 29, 633 - 648 (1940)

JALAVISTO, E. and L. SOLANTERA:
Methemoglobin reduction rate of nitrite treated red cells as a function of cell age.
Acta physiol. scand. 46, 273 - 283 (1959)

JUNG, F.:
Alter, hämolytische Resistenz und Methämoglobingehalt der Erythrocyten.
Dtsch. Arch. klin. Med. 195, 454 - 455 (1949)

JUNG, F. H. MATTHIES, K. ONNEN:
Über Stoffwechselleistungen von roten Blutkörperchen. II. Einfluß methämoglobinfreier Zellen auf die Methämoglobinrückbildung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
222, 474 - 481 (1954)

JUNG, F. und H. REMMER:
Über die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
206, 459 - 474 (1949)

KIESE, M., J. G. SCHÖBER und N. WEGER:
Versuche am Menschen zur Kinetik der Ferrihämoglobinbildung durch Aminophenole und Nitrit.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. 260,
152 - 153 (1968)

KÜBLER, W. und C. SIMON:
Nitrat - Nitritvergiftung im Säuglingsalter.
Bibliotheca "Nutritio et Dieta" Nr. 11, 111 - 119
Basel, New York: Karger 1969

LANG, K.:
Biochemie der Ernährung.
Beiträge zur Ernährungswissenschaft, 2. Aufl.
Darmstadt: Steinkopff 1970

MATTHIES, H.:
Über Stoffwechselleistungen von roten Blutkörperchen. I. Kationentransport und Methämoglobinrückbildung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 221, 497 - 505 (1954)

MATTHIES, H.:
Methämoglobinrückbildung in Reticulocyten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 229, 331 - 337 (1956)

MIRVISH, S. S.:
Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis.
J. nat. Cancer Inst. 44, 633 (1970)

MUSIL, J.:
Der Einfluß einer chronischen Natriumnitritintoxikation auf Ratten.
Acta bio. med. germ. 16, 388 - 394 (1966)

RAPOPORT, S. M.:
Medizinische Biochemie, 5. Aufl.
Berlin: VEB Volk und Gesundheit 1969

SANDER, J.:
Untersuchungen über die Entstehung cancerogener Nitrosoverbindungen im Magen von Versuchstieren und ihre Bedeutung für den Menschen.
Arzneimittel-Forsch. 10, 1572 - 1580, 1707 - 1713, 2034 - 2039 (1971)

SANDER, J., F. SCHWEINSBERG und H. P. MENZ:
Untersuchung über die Entstehung cancerogener Nitrosamine im Magen.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1691-1697(1968)

SATTELMACHER, P. G.:
Methämoglobinämie durch Nitrate im Trinkwasser.
In: Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Berlin-Dahlem, Nr. 20, 1 - 35
Stuttgart: Fischer 1962

SATTELMACHER, P. G.:
Gefahren durch Nitrate im Trinkwasser.
GWF 104, 1321 - 1322 (1963)

SCHUPHAN, W.:
Bildung von Nitrat und Nitrit im pflanzlichen Stoffwechsel.
Bibliotheca "Nutritio et Dieta" Nr. 11, 120 - 132
Basel, New York: Karger 1969

SCHWEINSBERG, F. und J. SANDER:
Cancerogene Nitrosamine aus einfachen aliphatischen tertiären Aminen und Nitrit.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 1671 - 1676 (1972)

SCHWILLE, F.:
Hohe Nitratgehalte in den Brunnenwässern der Moseltalaue zwischen Trier und Koblenz.
GWF 110, 35 - 44 (1969)

SIMON, C., H. MANZKE, H. KAY und G. MROWETZ:
Über Vorkommen, Pathogenese und Möglichkeiten zur Prophylaxe der durch Nitrit verursachten Methämoglobinämie.
Z. Kinderheilk. 91, 124 - 138 (1964)

SINOIS, A.:
Methämoglobinämie durch nitrathaltigen Spinat.
Münch. med. Wschr. 106, 1180 - 1182 (1964)

SINOIS, A. und W. WODSACK:
Die Spinatvergiftung des Säuglings.
Dtsch. med. Wschr. 90, 1856 - 1863 (1965)

SOUCHON, F.:
Schwere Methämoglobinämie bei einem Säugling hervorgerufen durch nitrathaltiges Brunnenwasser.
Dtsch. med. Wschr. 81, 1091 - 1092 (1956)

STURM, G. und F. J. BIBO:
Nitratgehalte des Trinkwassers, unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse im Rheingaukreis.
GWF 106, 332 - 334 (1965)

WALLER, H.D.:
Der Stoffwechsel der Erythrocyten.
Folia haematol.(Frankfurt) 9, 259 - 278 (1964)

WALLER, H. D., B.SCHLEGEL, A. A. MÜLLER und G. W. LÖHR:
Der Methämoglobingehalt in alternden Erythrocyten.
Klin. Wschr. 37, 898 - 900 (1959)

WEDEMEYER, F. W.:
Methämoglobinämie im frühen Säuglingsalter.
Z. ärztl. Fortbild. 51, 716 - 717 (1957)

WINTER, A. J. and J. F. HOKANSON:
Effects of long-term feeding of nitrate, nitrite, or hydroxylamine on pregnant dairy heifers.
Amer. J. vet. Res. 25, 353 - 361 (1964)

WORLD HEALTH ORGANIZATION:
European standards for drinking water.
Second edition, Genf (1970)

WORLD HEALTH ORGANIZATION:
International standards for drinking water.
Third edition, Genf (1971)

Lebenslauf

Am 17. Oktober 1947 wurde ich, Karl Vieweg, als Sohn des Tischlermeisters Friedrich Vieweg und seiner Ehefrau Helga Vieweg, geb. Brüning, in Minden/Westf. geboren.
1966 bestand ich die Reifeprüfung am Staatlichen Besselgymnasium in Minden und begann mit dem Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Zum Sommersemester 1967 konnte ich mich in die medizinische Fakultät einschreiben. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich am 30. März 1968, die ärztliche Vorprüfung am 1. September 1969 ab.
1970 erhielt ich einen Studienplatz an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, wo ich am 23. Januar 1973 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.